

PROCEDES IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUES EN PHASE SOLIDE

La présente invention concerne un procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide.

5 Les tests immunochromatographiques en phase solide sont bien connus de l'homme du métier. Ces tests mettent en œuvre un support solide poreux au sein duquel l'échantillon et les réactifs migrent par diffusion capillaire. On connaît notamment les dispositifs dans lesquels le support solide se présente sous la forme d'un « dip-stick ». Ces tests utilisent un support
10 solide chromatographique comportant une zone de détection sur laquelle est immobilisé un réactif de capture spécifique de l'analyte. Ce support solide est mis en contact avec une solution comprenant d'une part l'échantillon à tester et d'autre part un réactif de liaison marqué spécifique de l'analyte. Cette solution migre par diffusion capillaire dans le support solide jusqu'à la zone portant le
15 réactif de capture immobilisé. Dans un test sandwich, le réactif de liaison marqué se lie à l'analyte alors que ce dernier est immobilisé sur le support solide par le réactif de capture. La présence ou l'absence de l'analyte dans l'échantillon est ainsi mesurée par la détection du réactif marqué.

EP 0 284 232 décrit des tests immunochromatographiques en
20 phase solide dans lesquels le support solide porte directement, sous forme lyophilisée ou déshydratée, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire. Le réactif conjugué avec le marqueur particulaire est immobile sous forme lyophilisée mais devient mobile dans le support solide à l'état humide. Ainsi, lorsque le support solide est mis en contact avec un échantillon
25 liquide, ce dernier migre par diffusion capillaire dans le support entraînant le réactif de liaison conjugué au marqueur particulaire. Dans ces tests, il n'est pas nécessaire de mélanger préalablement le réactif conjugué et l'échantillon et tous les réactifs nécessaires au test sont donc intégrés au support solide. De plus, le réactif de liaison marqué spécifique de l'analyte est marqué avec un
30 marqueur particulaire détectable par observation directe. Aucune manipulation supplémentaire n'est donc nécessaire pour lire le résultat du test. Ces tests ne nécessitent donc que très peu de manipulations et sont d'un usage facile et rapide.

EP 0 291 194, EP 0 560 411 et EP 0 560 410 décrivent également
35 des dispositifs de test dans lesquels le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire est porté par le support solide. De plus dans ces

dispositifs, le support solide est incorporé dans un boîtier pourvu d'une ouverture pour le dépôt de l'échantillon et d'une fenêtre d'observation pour la lecture des résultats. Le boîtier facilite la préhension du dispositif et protège le support solide. En outre, ces brevets décrivent également des dispositifs dans
5 lesquels l'une des extrémités du support solide est saillante par rapport au boîtier pour faciliter le dépôt de l'échantillon liquide. Cette extrémité saillante du support solide peut ainsi être directement mise en contact avec un flux d'urine par exemple.

WO 00/00288 décrit des dispositifs améliorés comprenant un
10 boîtier et un support solide. Le support solide étant pourvu d'un organe de captation mobile pour une meilleure collecte de l'échantillon.

EP-A1-0 458 231 concerne des tests immunologiques en phase solide pour la détection d'un analyte dans un échantillon liquide. Ces tests mettent en œuvre un support solide, typiquement une membrane, sur laquelle
15 est immobilisé un réactif de capture de l'analyte. Après dépôt de l'échantillon, l'analyte immobilisé sur le support solide est détecté à l'aide d'un réactif de liaison conjugué à l'uréase. Ce document décrit des procédés dans lesquels l'échantillon puis le réactif de liaison marqué sont déposés sur le support solide.

EP-A2-0 462 376 décrit des tests immunochromatographiques à migration latérale. Les test décrits mettent en oeuvre un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière. Ce document décrit des tests dans
20 lesquels l'échantillon et le réactif de liaison conjugué sont appliqués séparément sur le support solide ou combinés préalablement au dépôt sur le support pour former une solution test. De préférence, le réactif de liaison conjugué est incorporé au support chromatographique.

US 6,008,056 décrit des dispositifs automatisés pour l'immunochromatographie latérale. Le réactif de liaison marqué est incorporé au support solide ou mélangé avec l'échantillon avant ou lors du dépôt sur le
30 support chromatographique.

EP-A1-1 020 726 décrit des tests immunochromatographiques à migration latérale. L'échantillon est déposé sur le support avant le réactif de liaison marqué ou un mélange comprenant l'échantillon et un ou plusieurs réactifs marqués est déposé sur le support.

WO-A1-97 09620 décrit des procédés de détection d'un analyte dans un échantillon par immunochromatographie quantitative ou semi quantitative. Le réactif de liaison marqué est incorporé au support solide.

5 Cependant, ces tests immunochromatographiques en phase solide présentent parfois une sensibilité et une reproductibilité insuffisantes. Ce problème se pose plus particulièrement pour la détection d'analytes présents à une faible concentration ou par la détection d'analytes dans un échantillon de nature complexe tel que du sang total par exemple. De plus, en raison de ces
10 déficiences de tels tests ne conviennent que pour déterminer l'absence ou la présence d'un analyte dans un échantillon et ne permettent donc que l'obtention d'un résultat qualitatif. Des mesures plus quantitatives ne sont que difficilement réalisables. En outre, on observe fréquemment un bruit de fond important ainsi qu'un effet de zone (ou « Hook effect ») qui altèrent la lisibilité
15 du résultat. L'effet de zone est un effet indésirable bien connu dans les tests immunologiques. Il se produit lorsque l'analyte est présent dans l'échantillon à une concentration très élevée. L'effet de zone peut alors conduire à un résultat négatif concluant de façon aberrante à l'absence de l'analyte dans l'échantillon.

 Pour remédier à ces inconvénients la présente invention propose
20 des procédés immunochromatographiques en phase solide permettant d'obtenir une sensibilité et une reproductibilité accrues tout en limitant le bruit de fond et les effets de zone. Les procédés selon l'invention sont particulièrement adaptés à des échantillons de nature complexe tel que du sang par exemple. Etant donné que le bruit de fond est diminué alors que la
25 sensibilité et la reproductibilité sont accrues, les procédés de la présente invention, permettent avantageusement de détecter plusieurs analytes différents de façon simultanée sur le même support. De plus, l'analyte présent dans l'échantillon liquide peut être mesuré et quantifié grâce aux performances des procédés selon l'invention.

30 Dans les procédés selon la présente invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière est ajouté extemporanément sous forme liquide. Ainsi, dans les procédés selon l'invention l'ordre de dépôt de l'échantillon et des divers réactifs revêt une grande importance pour la performance du test de détection.

Dans un premier mode de réalisation, le procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;
- b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux:
 - i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,
 - ii) l'échantillon liquide,
- c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et de l'échantillon liquide depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,
- d) on observe la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

Avantageusement à l'étape b) on dépose l'échantillon liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

La présente invention concerne également un procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

- a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;
- b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux :
 - i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,
 - ii) l'échantillon liquide,
 - iii) un diluant sous forme liquide,
- c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif conjugué à un marqueur particulière, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes
5 suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de
10 collection du support solide poreux:

i) l'échantillon liquide,

ii) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire, le réactif étant sous forme liquide,

iii) un diluant sous forme liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion
15 capillaire du réactif conjugué à un marqueur particulaire, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué
20 à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection.

Avantageusement, à l'étape b) on dépose le diluant sous forme liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et en amont de l'échantillon liquide par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

25 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test sandwich.

Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le réactif
30 de liaison conjugué à un marqueur particulaire et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test de compétition.

Préférentiellement, le support solide poreux est un support solide poreux en forme de bande ou de bandelette chromatographique.

35 Avantageusement, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant

d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection du support solide poreux.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le support de préhension est pourvu d'au moins une ouverture permettant respectivement le
5 dépôt de l'échantillon liquide, du réactif de liaison conjugué à un marqueur et, le cas échéant, du diluant sur la zone de collection du support solide poreux.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le
10 réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support solide poreux étant également pourvu d'une première ouverture permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le
15 dépôt dans la zone de collection du support solide poreux de l'échantillon liquide.

Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle
20 le réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support de préhension étant également pourvu d'une première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et de l'échantillon, et d'une deuxième ouverture, en amont de la première
25 ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du diluant sous forme liquide.

Préférentiellement, le support de préhension est constitué d'un boîtier.

La présente invention a aussi pour objet un kit de détection d'un
30 analyte dans un échantillon liquide comprenant a) un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection, et b) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire sous forme liquide.

Avantageusement, le kit de détection d'un analyte dans un
35 échantillon liquide selon l'invention comprend en outre un diluant.

De préférence, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension.

Préférentiellement, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation pour observer la zone de détection du support solide poreux.

Dans un mode de réalisation préféré, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une ouverture pour le dépôt de l'échantillon liquide et/ou du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et/ou du diluant dans la zone de collection du support solide poreux.

Préférentiellement, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension en forme de boîtier.

Par « analyte », on entend toute entité chimique, biochimique ou biologique que l'on souhaite détecter dans un échantillon. Parmi les analytes détectés par les procédés selon la présente invention, on citera notamment les protéines, les peptides, les anticorps, les hormones, les stéroïdes, les antigènes dérivés d'agents infectieux ou de cellules tumorales, les agents infectieux tels que les bactéries, les virus ou les parasites, les acides nucléiques (ADN ou ARN), les molécules thérapeutiques, les drogues ou encore les antibiotiques.

Par « détecter », on entend la détermination de la présence ou de l'absence d'un analyte dans un échantillon mais aussi la mesure et la quantification d'un analyte dans un échantillon. En effet, les performances des procédés selon l'invention autorisent la réalisation de mesures quantitatives ou semi quantitatives.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'analyte est la hCG (hormone choriogonadotropine) ou le PSA (antigène prostatique).

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, l'analyte est un acide nucléique. Dans ce cas, l'acide nucléique présent dans l'échantillon est préférentiellement amplifié préalablement selon des techniques bien connues de l'homme du métier (PCR, etc.). De préférence, cette étape d'amplification permet également de marquer l'acide nucléique amplifié en utilisant des amorces biotinylées ou par incorporation de nucléotides marqués à la biotine par exemple. Alternativement, l'acide nucléique peut être, par exemple, marqué à la biotine à son extrémité 3' à l'aide d'une terminale transférase appropriée. Avant le dépôt l'échantillon est dénaturé soit par choc

thermique soit en présence d'une solution de NaOH 0,2 N, EDTA 0,05 M ou de toute autre méthode appropriée. Cette étape de dénaturation permet d'obtenir des acides nucléiques simple brin.

Par « échantillon liquide », on entend tout échantillon dans lequel
5 l'analyte recherché est en solution ou en suspension. Cet échantillon liquide peut notamment être tout fluide biologique ou corporel. L'échantillon liquide peut également avoir été obtenu directement ou indirectement à partir d'un fluide biologique ou corporel. L'échantillon peut également être un extrait liquide d'un échantillon solide.

10 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'échantillon liquide est de l'urine, du sang total, du plasma ou du sérum.

Les réactifs mis en œuvre dans les procédés selon la présente invention sont bien connus de l'homme du métier.

Le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le
15 réactif de capture sont spécifiques de l'analyte recherché dans l'échantillon.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection du support solide permettent de détecter l'analyte par un test sandwich.

20 Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture spécifique de l'analyte immobilisé dans la zone de détection du support solide permettent de détecter l'analyte par un test de compétition.

Les tests sandwich et les tests par compétition sont bien connus de
25 l'homme du métier. Dans un test sandwich, le réactif de capture spécifique de l'analyte et le réactif de liaison marqué sont prédéterminés pour se lier respectivement et spécifiquement avec l'analyte, par exemple sur deux sites épitopiques, identiques ou différents de l'analyte. Dans un test par compétition, le réactif de liaison marqué est identique ou analogue à l'analyte, pour se lier
30 avec le réactif de capture, en compétition avec l'analyte.

Par « réactif de capture », on entend toute entité chimique biochimique ou biologique susceptible de se lier spécifiquement avec l'analyte.

Dans le cas d'un test par compétition, le réactif de capture se lie également au réactif de liaison. L'analyte et le réactif de capture forment
35 typiquement un couple ligand/anti-ligand, antigène/anticorps, ADN/ARN ou ADN/ADN. Ainsi, si l'analyte est un antigène ou un haptène, le réactif de

capture est par exemple un anticorps spécifique de l'analyte. Si l'analyte est un anticorps, le réactif de capture est l'antigène reconnu par l'anticorps ou un anticorps reconnaissant spécifiquement l'analyte. Si l'analyte est un acide nucléique, le réactif de capture est par exemple une sonde ADN
5 complémentaire.

Le réactif de capture immobilisé est préférentiellement un anticorps polyclonal ou monoclonal ayant une forte affinité pour l'analyte et plus préférentiellement il s'agit d'un anticorps monoclonal.

Le réactif de capture spécifique de l'analyte est immobilisé sur le
10 support solide selon des techniques connues de l'homme du métier. Ce réactif de capture est immobilisé de telle façon qu'il ne soit pas mobile à l'état humide. Cette immobilisation peut s'effectuer par exemple par absorption ou par un couplage covalent. Lorsque le réactif de capture est un acide nucléique, il est par exemple fixé sur un support de type nitrocellulose par un traitement UV ou
15 par toute autre technique connue de l'homme du métier.

Par « réactif de liaison », on entend toute entité chimique biochimique ou biologique susceptible de se lier spécifiquement avec l'analyte ou avec le réactif de capture en compétition avec l'analyte.

Par « lier » ou « liaison », on entend toute liaison forte, par exemple
20 covalente ou toute liaison faible, par exemple du type antigène/anticorps ou avidine/streptavidine.

Le réactif de liaison est par exemple un anticorps, un antigène ou un acide nucléique.

Tout autre réactif de liaison connu de l'homme du métier peut être
25 utilisé tel que un (ou des anticorps) monoclonal aux antibiotine, de l'avidine, de la streptovidine, ou de la polytroptavidine. Ces réactifs peuvent être natifs ou recombinants.

Dans un test par compétition, le réactif de liaison est par exemple l'analyte lui-même ou un analogue approprié de l'analyte. Par analogue approprié de l'analyte, on entend un analogue se liant de manière spécifique au réactif de capture spécifique de l'analyte. Le réactif de liaison marqué est donc l'analyte conjugué à un marqueur particulière ou un analogue de l'analyte conjugué à un marqueur particulière.
30

Dans un test de type sandwich, le réactif de liaison se lie de façon spécifique à l'analyte. Le réactif de liaison marqué est donc par exemple un
35 anticorps spécifique de l'analyte conjugué à un marqueur particulière.

Lorsque l'analyte est un acide nucléique marqué à la biotine, le réactif de liaison est typiquement un anticorps anti-biotine conjugué à un marqueur particulaire tel que de l'or colloïdal par exemple.

Le réactif de liaison est conjugué à un marqueur particulaire
5 permettant une mesure ou une observation directe du résultat du test. Le marqueur particulaire peut être observé directement à l'œil nu lorsqu'il est concentré dans la zone de détection du support solide. La mesure du marqueur particulaire peut s'effectuer directement à l'œil nu ou à l'aide d'un appareil de mesure. Cette mesure se fait par une observation directe ne nécessitant pas
10 de manipulation supplémentaire. Typiquement, les marqueurs particuliers sont constitués de particules de petite taille insolubles dans l'eau et qui forment donc des suspensions en phase liquide c'est-à-dire une dispersion de particules solides dans un liquide.

Les marqueurs particuliers sont bien connus de l'homme du
15 métier. On connaît notamment les marqueurs particuliers colorés ou fluorescents. A titre d'exemple, on citera l'or colloïdal, les particules de latex colorées, les particules de latex fluorescentes et les particules conjugués à l'avidine ou à la streptavidine.

Parmi les marqueurs permettant une observation directe à l'œil nu
20 on citera aussi les marqueurs de type dextran (Hansen T.M., *IVD Technology* 4, 35-40, 2003). Le réactif de liaison est alors conjugué à une chaîne de dextran (dérivé de polysaccharide) portant des fluorophores.

Le réactif de liaison est conjugué au marqueur particulaire selon des techniques connues.

25 Dans les procédés selon la présente invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire est sous forme liquide.

Par « réactif sous forme liquide », on entend tout réactif dans lequel le réactif de liaison est en solution ou en suspension. La préparation du réactif de liaison conjugué au marqueur particulaire sous forme liquide se fait selon
30 des techniques décrites dans la littérature. Habituellement, le réactif de liaison conjugué est en solution ou en suspension dans une solution saline tamponnée. Cette solution peut également comprendre des agents stabilisants et d'autres composés tels que des anti-bactériens ou des anti-fongiques. Parmi les agents stabilisants on citera par exemple la sérum albumine bovine (BSA)
35 et la caséine.

Dans certains procédés selon la présente invention, un diluant est utilisé lorsque l'échantillon liquide est du plasma, du sérum ou du sang total par exemple. Ce diluant migre dans le support solide entraînant l'échantillon et le réactif de liaison marqué. Typiquement ce diluant est composé d'une solution saline tamponnée, il peut également comprendre un détergent ou tout autre composant nécessaire à la réaction.

Dans les procédés de détection d'acides nucléiques, le diluant peut être constitué d'un tampon d'hybridation. De tels tampons d'hybridation sont bien connus de l'homme du métier.

Les supports solides poreux mis en œuvre dans les tests immunochromatographiques selon l'invention sont bien connus de l'homme du métier (EP 0 284 232). La porosité du support permet la diffusion capillaire de l'échantillon et des réactifs à l'état liquide ou humide.

A titre d'exemple, le support solide poreux peut être constitué de divers supports chromatographiques, de cellulose, de nylon, de nitrocellulose, de polyéthylène ou de fibre de verre.

Le support solide peut être constitué d'une ou de plusieurs parties distinctes. Les différentes parties du support pouvant être constitués de matériaux différents. Lorsque le support solide est constitué de différentes parties ou de différents matériaux, ces éléments sont disposés de telle façon à permettre la continuité de l'écoulement capillaire dans le support solide.

De préférence, le support solide poreux est un support solide poreux en forme de bande ou de bandelette chromatographique.

Le support solide peut ainsi se présenter sous la forme d'une bande chromatographique constituée de plusieurs bandelettes superposés ou chevauchantes.

Typiquement, le support solide poreux comporte une zone de collection de l'échantillon et une zone de détection portant le réactif de capture. Ces zones sont disposées de façon à permettre la continuité de l'écoulement capillaire depuis la zone de collection jusqu'à la zone de détection. La zone de collection et la zone de détection sont deux zones distinctes et séparées du support solide poreux. L'échantillon, le réactif de liaison marqué et le cas échéant le diluant sont déposés au niveau de la zone de collection et migrent à travers le support solide poreux jusqu'à la zone de détection. Le support solide poreux est ainsi par exemple constitué d'une bande chromatographique dont

l'une des extrémités constitue la zone de collection, la zone de détection étant situé à proximité de l'autre extrémité de la bande.

Ces zones peuvent par exemple être présentes dans un même plan sur une bande constitué d'un matériau unique. Avantageusement, un
5 matériau spécifique correspond à chaque zone du support solide. Un matériau absorbant poreux peut par exemple être utilisé pour la zone de collection de l'échantillon.

La zone de collection de l'échantillon du support solide peut ainsi être constitué d'un organe de captation en matériau absorbant. Cet organe de
10 captation peut être directement mis en contact avec un flux d'urine par exemple. Le support solide peut également comprendre un organe de captation mobile tel que décrit dans WO 00/00288.

La zone de détection du support solide poreux peut également comporter un deuxième réactif de capture immobilisé sur le support poreux en
15 aval du premier réactif de capture. Ce deuxième réactif de capture immobilisé permet de contrôler le bon déroulement du test en vérifiant par exemple la migration du réactif de liaison conjugué au marqueur particulière dans le support solide. Le deuxième réactif de capture est par exemple un anticorps spécifique du réactif de liaison.

20 Dans les procédés selon la présente invention, le réactif de liaison marqué, l'échantillon et le cas échéant le diluant sont déposés séparément, successivement et sous forme liquide dans la zone de collection du support solide. Le dépôt extemporané du réactif de liaison marqué sous forme liquide avant l'échantillon et/ou avant le diluant permet de diminuer bruit de fond et
25 effet de zone tout en augmentant la sensibilité grâce au contact immédiat et total entre l'échantillon et le réactif de liaison marqué. La reproductibilité des procédés selon l'invention est également considérablement augmentée par le dosage précis du réactif de liaison marqué ajouté sous forme liquide.

De plus, dans les procédés selon la présente invention le dépôt
30 extemporané du réactif de liaison marqué sous forme liquide avant l'échantillon et/ou avant le diluant permet d'obtenir un effet de lavage qui conduit à une diminution du bruit de fond et de l'effet de zone. Ceci est particulièrement avantageux pour la détection d'analytes dans un échantillon complexe tel que du sang par exemple.

35 De façon avantageuse, l'échantillon ou le diluant est déposé dans la zone de collection en amont du réactif de liaison marqué.

Afin de contrôler la quantité de réactif de liaison marqué déposé sur la zone de collection du support solide poreux, ce dépôt s'effectue de préférence à l'aide d'une pipette, d'un goutte à goutte ou d'un flacon compte-gouttes.

5 L'échantillon liquide peut également être déposé à l'aide d'une pipette, d'un goutte à goutte ou d'un flacon compte-gouttes. Dans un autre mode de réalisation, le dépôt de l'échantillon est effectué en trempant la zone de collection du support solide dans l'échantillon liquide. Lorsque l'échantillon liquide est de l'urine, la zone de collection du support solide peut aussi être
10 directement mise en contact avec un flux d'urine.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension. Ce support de préhension peut envelopper partiellement ou totalement le support solide poreux. Habituellement, le support de préhension est en forme de boîtier.

15 Ces supports de préhension ou boîtiers sont notamment décrits dans EP 0 291 194, EP 0 560 411, EP 0 560 410 et dans WO 00/00288.

Le support de préhension facilite la manipulation du support solide poreux et protège celui-ci de l'humidité notamment.

20 Le support de préhension peut être constitué de matériaux divers tel que du carton, du carton plastifié ou plus préférentiellement de matières plastiques. De façon avantageuse, le support de préhension est constitué d'un matériau rigide et imperméable.

Typiquement, le support de préhension est pourvu d'au moins une fenêtre d'observation pour observer la zone de détection du support solide
25 poreux.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le support solide poreux peut comprendre une zone de collection saillante par rapport au support de préhension pour le dépôt de l'échantillon liquide et/ou du réactif de liaison marqué et/ou du diluant.

30 Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le support de préhension ou le boîtier comprend au moins une ouverture pour le dépôt de l'échantillon liquide et/ou du réactif de liaison marqué et/ou du diluant dans la zone de collection du support solide poreux.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des figures et des
35 exemples ci-dessous :

Figures

Figure 1 : Principes des procédés immunochromatographiques de l'invention

- 5 Les régions grisées représentent des parties du support solide constituées d'un matériau absorbant.

Figure 2 : Dispositif pour tests immunochromatographiques

- La figure 2 représente un dispositif comprenant un boîtier comprenant un support solide poreux. Le boîtier est pourvu d'une ouverture (O) pour le dépôt des liquides et d'une fenêtre d'observation (F). La figure 2a représente le dépôt des liquides sur le support solide par l'ouverture dans le boîtier. La figure 2b montre un résultat négatif visible par la fenêtre d'observation (F). La figure 2b montre un résultat positif pour un test sandwich visible par la fenêtre d'observation (F).
- 10
15

T= ligne de test, C= ligne de contrôle, O= ouverture, F= fenêtre d'observation.

Figure 3 : Dispositif pour tests immunochromatographiques à deux puits

- La figure 3 représente un boîtier comprenant un support solide poreux. Le boîtier est pourvu de deux ouvertures distinctes (O1 et O2) pour le dépôt des liquides et d'une fenêtre d'observation. La flèche indique le sens de migration par diffusion capillaire.
- 20

O1= ouverture n° 1, O2= ouverture n°2, T= ligne de test, C= ligne de contrôle.

25

Figure 4 : Exemples comparatifs avec diluant

R= réactif de liaison marqué, E= échantillon, D= diluant, T= ligne de test, C= ligne de contrôle.

30 **Figure 5** : Exemples comparatifs sans diluant

R= réactif de liaison marqué, E= échantillon, T= ligne de test, C= ligne de contrôle.

Exemples

Exemple 1 : Procédés immunochromatographiques avec diluant

5 Dispositif

Les procédés ont été mis en œuvre avec les dispositifs représentés à la figure 2 et à la figure 3.

Analyte et échantillon

10 L'analyte est l'antigène prostatique (PSA) détecté dans du sérum. Le test pourrait être réalisé de la même façon avec du sang total ou du plasma.

Réactifs et diluant

Le réactif de liaison marqué est un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-PSA conjugué avec de l'or colloïdal dans un tampon (PBS 0,1M, pH 8) contenant de la sérum albumine bovine (BSA 1%) comme stabilisant.

15 Au niveau de la ligne de test de la zone de détection est immobilisé un premier réactif de capture. Ce premier réactif de capture est un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-PSA.

Au niveau de la ligne de contrôle de la zone de détection est immobilisé un deuxième réactif de capture. Ce deuxième réactif de capture est un anticorps
20 monoclonal ou polyclonal dirigé contre l'anticorps du réactif de liaison marqué. Le diluant est constitué d'un tampon PBS (0,1 M, pH 8) contenant un détergent (0,05% Tween 20).

Procédés

Les différents procédés qui ont été comparés sont représentés dans la figure 4.

25 Les procédés A, B et C sont conformes à l'invention. Dans tous les cas, la quantité d'échantillon et la quantité de réactif de liaison conjugué au marqueur particulaire par test étaient identiques quelle que soit le procédé considéré pour ne pas fausser les résultats.

Volume échantillon = 25 µl (Version A, B, C, D, E)

30 Volume diluant = 100 µl (Version A, B, C, D), 150 µl (Version E).

Volume réactif de liaison marqué = 35 µl (Version A, B, C, D), identique mais sous forme déshydratée (Version E).

Les procédés ont été réalisés de la façon suivante :

Version A

- 35 1) Réactif de liaison marqué
 2) Echantillon

3) Diluant

Version B

- 1) Echantillon dans ouverture 2
- 2) Réactif de liaison marqué dans ouverture 2
- 5 3) Diluant dans ouverture 1 (en amont de l'ouverture 2).

Version C

- 1) Echantillon
- 2) Réactif de liaison marqué
- 3) Diluant

10 Version D

- 1) Echantillon et réactif de liaison marqué pré-mélangés
- 2) Diluant

Version E

- 1) Echantillon
- 15 2) Diluant

Dans ce dernier procédé le réactif de liaison marqué est directement porté par le support solide.

Résultats

- 20 Les performances obtenues pour chacun des procédés ont été mesurées et quantifiées à l'aide d'un réflectomètre. L'effet de zone est évalué en utilisant un échantillon très concentré en analyte.

Procédé	Bruit de fond	Effet de zone	Sensibilité	Reproductibilité
A	4	5	5	4
B	5	3	4	4
C	4	4	3	4
D	4	4	2	4
E	3	2	1	2

Classification de 1 à 5 (1 le moins performant, 5 le plus performant).

Exemple 2 : Procédés immunochromatographiques sans diluant

Dispositif

Les procédés ont été mis en œuvre avec les dispositifs représentés à la figure 2 et à la figure 3.

Analyte et échantillon

L'analyte est l'hormone choriogonadotropine (hCG) détectée dans de l'urine. Le test pourrait être réalisé de la même façon avec du serum ou du plasma.

Réactifs

Le réactif de liaison marqué est un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-hCG conjugué avec de l'or colloïdal dans un tampon (PBS 0,1M, pH 8) contenant de la sérum albumine bovine (BSA 1%) comme stabilisant.

Au niveau de la ligne de test de la zone de détection est immobilisé un premier réactif de capture. Ce premier réactif de capture est un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-hCG.

Au niveau de la ligne de contrôle de la zone de détection est immobilisé un deuxième réactif de capture. Ce deuxième réactif de capture est un anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre l'anticorps du réactif de liaison marqué.

Procédés

Les différents procédés qui ont été comparés sont représentés dans la figure 5. Les procédés A et B sont conformes à l'invention. Dans tous les cas, la quantité d'échantillon et la quantité de réactif de liaison conjugué au marqueur particulière par test étaient identiques quelle que soit le procédé considéré pour ne pas fausser les résultats.

Volume échantillon = 100 μ l (Version A, B, D); 100 μ l + 35 μ l (Version E)

Volume réactif de liaison marqué = 35 μ l (Version A, B, D), identique mais sous forme déshydratée (Version E).

Les procédés ont été réalisés de la façon suivante :

Version A

- 1) Réactif de liaison marqué
- 2) Echantillon

Version B

- 1) Réactif de liaison marqué dans ouverture 2
- 2) Echantillon dans ouverture 1

Version D

- 1) Echantillon et réactif de liaison marqué pré-mélangés

Version E

1) Echantillon

Dans ce dernier procédé le réactif de liaison marqué est directement porté par le support solide.

5 Résultats

Les performances obtenues pour chacun des procédés ont été mesurées et quantifiées à l'aide d'un réflectomètre. L'effet de zone est évalué en utilisant un échantillon très concentré en analyte.

Procédé	Bruit de fond	Effet de zone	Sensibilité	Reproductibilité
A	4	4	4	4
B	5	5	1	4
D	3	1	5	4
E	3	3	3	2

10

Classification de 1 à 5 (1 le moins performant, 5 le plus performant).

Exemple 3 : Procédé de détection de la morphine (test compétition)

15 Dispositif

Ce procédé a été mis en œuvre avec le dispositif représenté à la figure 2.

Analyte et échantillon

L'analyte est la morphine détectée dans de l'urine.

Réactifs

20 Le réactif de liaison marqué est un haptène morphine-BSA conjugué à des particules d'or colloïdal dans un tampon (PBS 0,1M, pH 8) contenant de la sérum albumine bovine (BSA 1%) comme stabilisant.

Au niveau de la ligne de test de la zone de détection est immobilisé un réactif de capture. Ce premier réactif de capture est un anticorps monoclonal anti-

25 morphine.

Procédé

Dépôt de 35 μ l de réactif de liaison conjugué au marqueur particulière puis dépôt de 150 μ l d'urine dans le même puit du boîtier. Lecture des résultats 5 minutes plus tard.

Résultats

Par rapport à un test mettant en œuvre un support solide portant le réactif de liaison conjugué sous forme déshydratée, le bruit de fond est diminué et la reproductibilité est améliorée.

5

Exemple 4 : Procédé de détection d'un acide nucléique

Dispositif

Ce procédé est mis en œuvre avec le dispositif représenté à la figure 2.

- 10 Le dispositif comprend une bandelette de nitrocellulose sur laquelle est fixée (par traitement UV ou par toute autre technique) une sonde spécifique d'un acide nucléique d'*E.coli* ou de *Chlamydia*. La bandelette est incluse dans un boîtier en plastique pourvu d'une ouverture pour le dépôt des réactifs et d'une fenêtre d'observation.

15 Analyte et échantillon

- L'analyte recherché dans l'échantillon est un ADN ou un ARN d' *E.coli* ou de *Chlamydia*. L'acide nucléique est préalablement amplifié selon des méthodes classiques comme par exemple la PCR. Le marquage de l'ADN est réalisé au moyen d'amorces biotinylées ou par incorporation de nucléotides marqués à la
- 20 biotine. Alternativement, l'extrémité 3' des acides nucléiques est marquée à la biotine à l'aide d'une terminale transférase.

Réactifs

Le réactif de liaison marqué est un anticorps polyclonal de lapin anti-biotine marqué à l'or colloïdal.

- 25 Le tampon d'hybridation est un tampon PBS contenant 0,1% de Tween 20. D'autres tampons d'hybridation peuvent être utilisés.

Procédé

- Les acides nucléiques amplifiés et marqués à la biotine (échantillon) sont dénaturés soit par choc thermique, soit en présence de NaOH 1,2N, EDTA
- 30 0,05 M.

25 µl d'échantillon dénaturé sont déposés dans le puit échantillon (ouverture). 40 µl de réactif de liaison marqué (conjugué anti-biotine) sont ensuite déposés dans le puit échantillon. Ces deux premières étapes peuvent être inversées.

- 150 µl à 200 µl de tampon d'hybridation sont ensuite déposés dans le puit échantillon.
- 35

Résultats

Lorsque l'acide nucléique recherché est présent dans l'échantillon il migre par diffusion depuis la zone de collection jusqu'à la zone de détection où il se fixe à la sonde immobilisée sur le support. Une bande rouge apparaît dans la zone test (lecture du test 10 à 20 minutes après les dépôts). La ligne de contrôle
5 apparaît également dans la zone de détection et montre la bonne fonctionnalité des réactifs.

REVENDICATIONS

- 1) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide
5 comprenant les étapes suivantes :
- a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;
 - b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de
10 collection du support solide poreux:
 - i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,
 - ii) l'échantillon liquide,
 - c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion
15 capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et de l'échantillon liquide depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,
 - d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.
- 20
- 2) Procédé selon la revendication 1 dans lequel à l'étape b) on dépose l'échantillon liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.
- 25
- 3) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :
- a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé
30 dans la zone de détection ;
 - b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux :
 - i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,
 - 35 ii) l'échantillon liquide,
 - iii) un diluant sous forme liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

5 d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

4) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

10 a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux:

15 i) l'échantillon liquide,

ii) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

iii) un diluant sous forme liquide,

20 c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu'à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

25

5) Procédé selon l'une des revendications 3 ou 4 dans lequel à l'étape b) on dépose le diluant sous forme liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et en amont de l'échantillon liquide par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

30

6) Procédé selon l'une des revendications 1-5 dans lequel le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test sandwich.

35

7) Procédé selon l'une des revendications 1-5 dans lequel le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test de compétition.

5

8) Procédé selon l'une des revendications 1-7 dans lequel le support solide poreux est un support solide poreux en forme de bande ou de bandelette chromatographique.

10

9) Procédé selon l'une des revendications 1-8 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection du support solide poreux.

15

10) Procédé selon la revendication 9 dans lequel le support de préhension est pourvu d'au moins une ouverture permettant respectivement le dépôt de l'échantillon liquide, du réactif de liaison conjugué à un marqueur et, le cas échéant, du diluant dans la zone de collection du support solide poreux.

20

11) Procédé selon la revendication 2 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support solide poreux étant également pourvu d'une première ouverture permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux de l'échantillon liquide.

30

12) Procédé selon la revendication 5 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support de préhension étant également pourvu d'une première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support

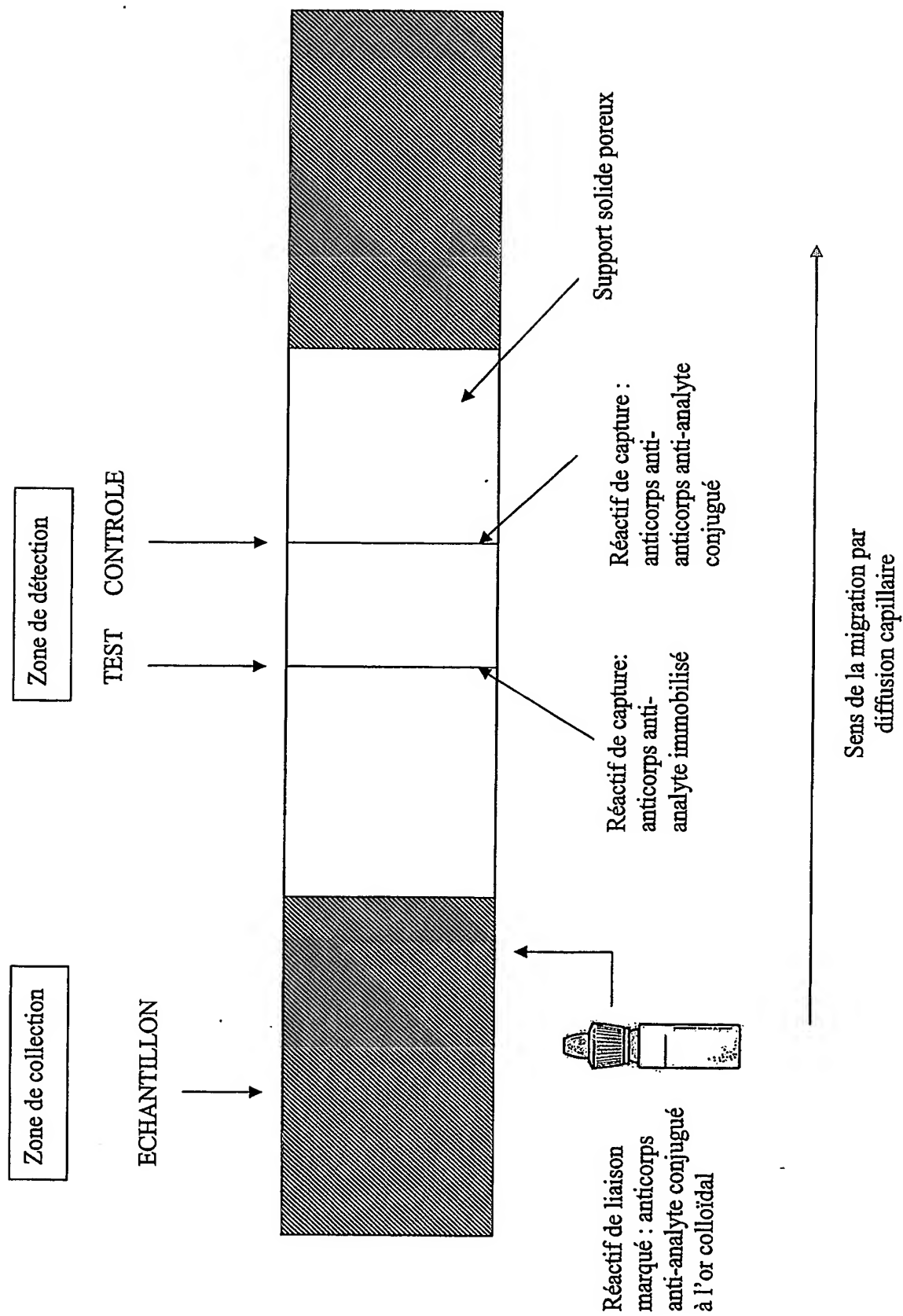
35

solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et de l'échantillon, et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du diluant sous forme liquide.

5

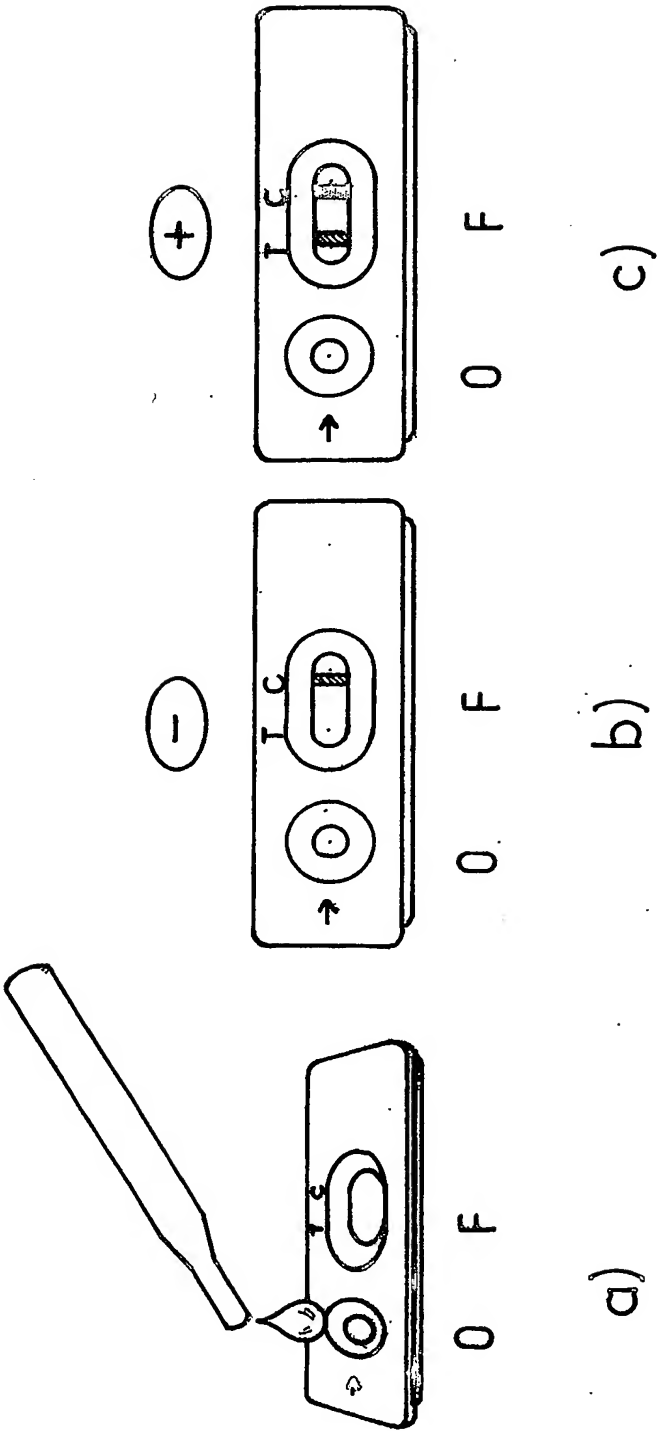
13) Procédé selon l'une des revendications 9-12 dans lequel le support de préhension est constitué d'un boîtier.

Fig. 1



2/5

FIG 2



3/5

FIG 3

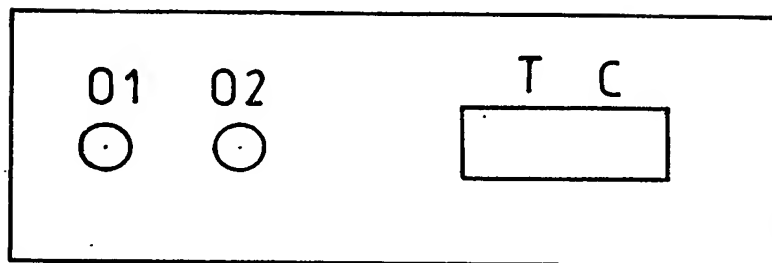
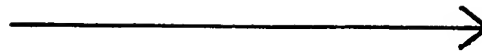
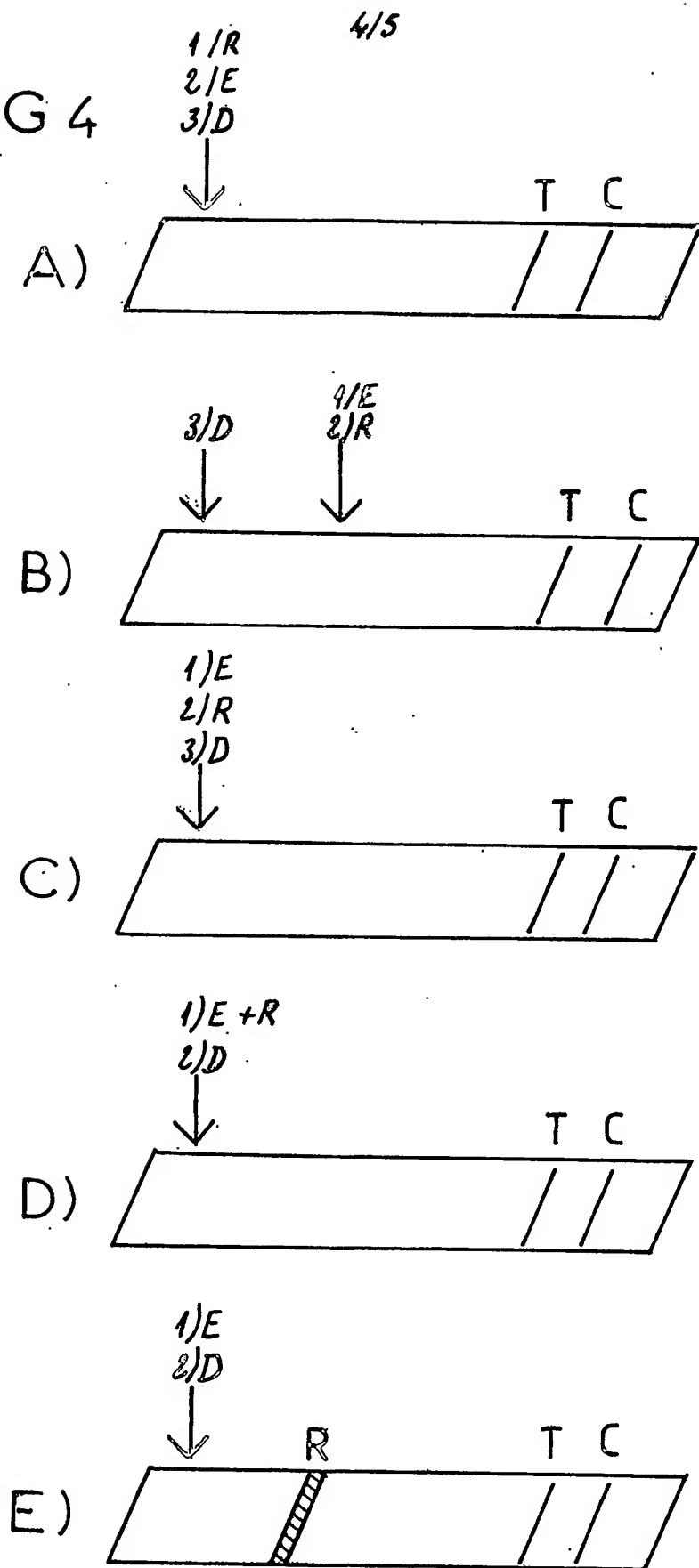
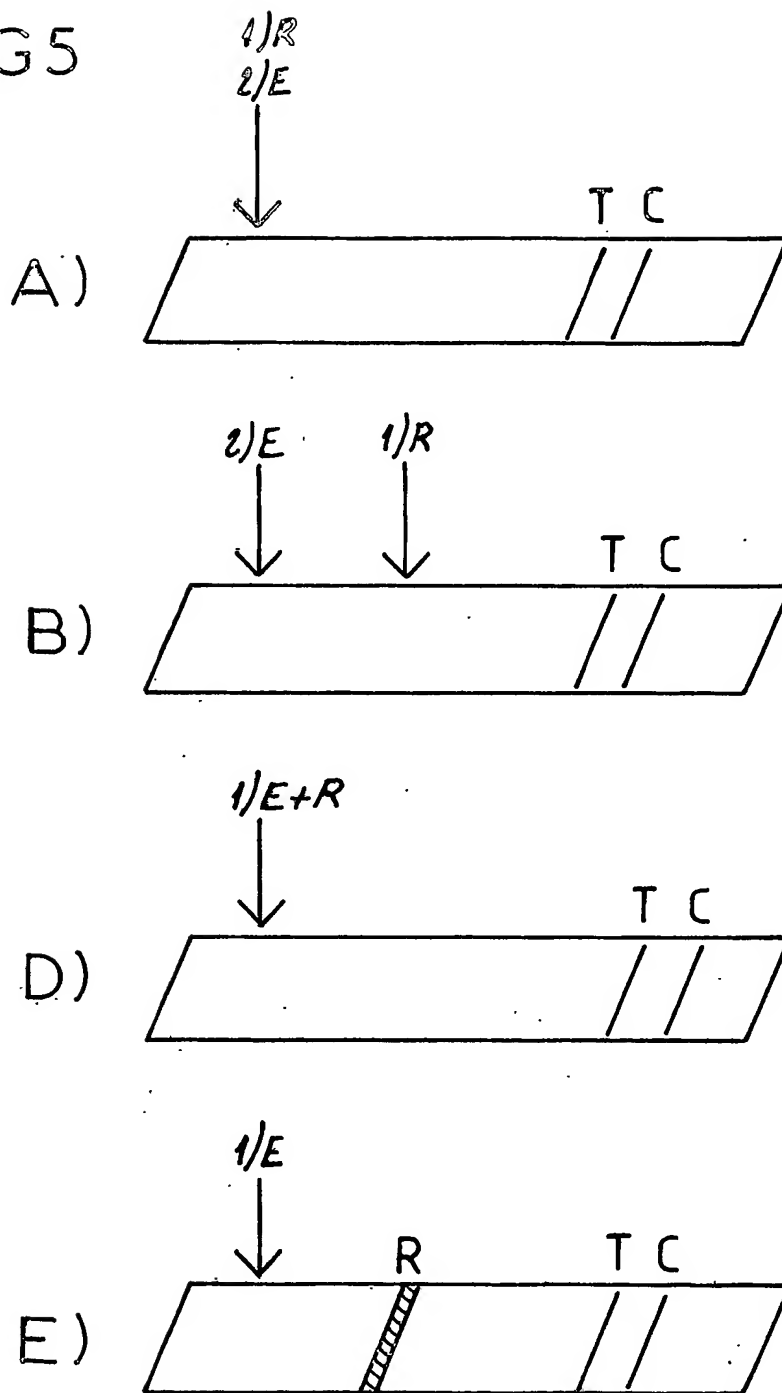


FIG 4



5/5

FIG 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/000775

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/558 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 458 231 A (BECTON DICKINSON CO) 27 November 1991 (1991-11-27) column 2, lines 29-50 column 4, lines 26-50	4, 6
Y	column 6, lines 15-30	1-3, 5, 7-13
Y	----- EP 0 462 376 A (ABBOTT LAB) 27 December 1991 (1991-12-27) page 7, line 43 - page 8, line 28	1-3, 5, 7-13
A	----- US 6 008 056 A (THIEME THOMAS) 28 December 1999 (1999-12-28) column 3, line 10 - column 4, line 55 ----- -/--	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 September 2004

Date of mailing of the international search report

23/09/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diez Schlereth, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/000775

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 020 726 A (NITTO DENKO CORP) 19 July 2000 (2000-07-19) page 2, line 40 - page 3, line 27; figure 3 -----	1-13
A	WO 97/09620 A (AGEN BIOMEDICAL LTD ; RYLATT DENNIS BRIAN (AU); MOSS DEAN (AU); JAN) 13 March 1997 (1997-03-13) the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/000775

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0458231	A	27-11-1991	US 5139934 A	18-08-1992
			AU 640750 B2	02-09-1993
			AU 7278491 A	28-11-1991
			CA 2037521 A1	26-11-1991
			EP 0458231 A1	27-11-1991
			IE 910682 A1	04-12-1991
			JP 4231874 A	20-08-1992
			JP 6105255 B	21-12-1994
			US 5370994 A	06-12-1994
			US 5328831 A	12-07-1994
EP 0462376	A	27-12-1991	AT 140794 T	15-08-1996
			AU 637489 B2	27-05-1993
			AU 7598691 A	14-11-1991
			CA 2041782 A1	10-11-1991
			DE 69121021 D1	29-08-1996
			DE 69121021 T2	27-02-1997
			EP 0462376 A2	27-12-1991
			ES 2092523 T3	01-12-1996
			JP 4230857 A	19-08-1992
US 6008056	A	28-12-1999	NONE	
EP 1020726	A	19-07-2000	JP 2000019176 A	21-01-2000
			JP 2000019173 A	21-01-2000
			JP 2000019174 A	21-01-2000
			JP 2000019175 A	21-01-2000
			JP 2000028612 A	28-01-2000
			JP 2000028613 A	28-01-2000
			JP 2000028611 A	28-01-2000
			JP 2000028610 A	28-01-2000
			JP 2000028614 A	28-01-2000
			JP 2000206114 A	28-07-2000
			JP 2000221193 A	11-08-2000
			JP 2000221194 A	11-08-2000
			EP 1020726 A1	19-07-2000
			US 6753190 B1	22-06-2004
			WO 0002049 A1	13-01-2000
WO 9709620	A	13-03-1997	AU 710737 B2	30-09-1999
			AU 6782596 A	27-03-1997
			WO 9709620 A1	13-03-1997
			EP 0864090 A1	16-09-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/000775

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/558 G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 458 231 A (BECTON DICKINSON CO) 27 novembre 1991 (1991-11-27) colonne 2, ligne 29-50 colonne 4, ligne 26-50	4,6
Y	colonne 6, ligne 15-30	1-3,5, 7-13
Y	----- EP 0 462 376 A (ABBOTT LAB) 27 décembre 1991 (1991-12-27) page 7, ligne 43 - page 8, ligne 28	1-3,5, 7-13
A	----- US 6 008 056 A (THIEME THOMAS) 28 décembre 1999 (1999-12-28) colonne 3, ligne 10 - colonne 4, ligne 55 ----- -/--	1-13

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 septembre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/09/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Diez Schlereth, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/000775

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 1 020 726 A (NITTO DENKO CORP) 19 juillet 2000 (2000-07-19) page 2, ligne 40 - page 3, ligne 27; figure 3	1-13
A	----- WO 97/09620 A (AGEN BIOMEDICAL LTD ; RYLATT DENNIS BRIAN (AU); MOSS DEAN (AU); JAN) 13 mars 1997 (1997-03-13) le document en entier -----	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2004/000775

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0458231	A	27-11-1991	US 5139934 A	18-08-1992
			AU 640750 B2	02-09-1993
			AU 7278491 A	28-11-1991
			CA 2037521 A1	26-11-1991
			EP 0458231 A1	27-11-1991
			IE 910682 A1	04-12-1991
			JP 4231874 A	20-08-1992
			JP 6105255 B	21-12-1994
			US 5370994 A	06-12-1994
			US 5328831 A	12-07-1994
EP 0462376	A	27-12-1991	AT 140794 T	15-08-1996
			AU 637489 B2	27-05-1993
			AU 7598691 A	14-11-1991
			CA 2041782 A1	10-11-1991
			DE 69121021 D1	29-08-1996
			DE 69121021 T2	27-02-1997
			EP 0462376 A2	27-12-1991
			ES 2092523 T3	01-12-1996
			JP 4230857 A	19-08-1992
US 6008056	A	28-12-1999	AUCUN	
EP 1020726	A	19-07-2000	JP 2000019176 A	21-01-2000
			JP 2000019173 A	21-01-2000
			JP 2000019174 A	21-01-2000
			JP 2000019175 A	21-01-2000
			JP 2000028612 A	28-01-2000
			JP 2000028613 A	28-01-2000
			JP 2000028611 A	28-01-2000
			JP 2000028610 A	28-01-2000
			JP 2000028614 A	28-01-2000
			JP 2000206114 A	28-07-2000
			JP 2000221193 A	11-08-2000
			JP 2000221194 A	11-08-2000
			EP 1020726 A1	19-07-2000
			US 6753190 B1	22-06-2004
			WO 0002049 A1	13-01-2000
WO 9709620	A	13-03-1997	AU 710737 B2	30-09-1999
			AU 6782596 A	27-03-1997
			WO 9709620 A1	13-03-1997
			EP 0864090 A1	16-09-1998